

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4079996号  
(P4079996)

(45) 発行日 平成20年4月23日(2008.4.23)

(24) 登録日 平成20年2月15日(2008.2.15)

(51) Int. Cl.		F I	
<b>A 6 1 B</b>	<b>5/055 (2006.01)</b>	A 6 1 B	5/05 3 8 3
<b>A 6 1 K</b>	<b>47/02 (2006.01)</b>	A 6 1 K	47/02
<b>C O 1 G</b>	<b>49/00 (2006.01)</b>	C O 1 G	49/00 Z
<b>C 1 2 M</b>	<b>1/00 (2006.01)</b>	C 1 2 M	1/00 A
<b>G O 1 R</b>	<b>33/28 (2006.01)</b>	G O 1 N	24/02 A

請求項の数 8 (全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-533047  
(86) (22) 出願日 平成9年3月13日(1997.3.13)  
(65) 公表番号 特表2000-507197(P2000-507197A)  
(43) 公表日 平成12年6月13日(2000.6.13)  
(86) 国際出願番号 PCT/DE1997/000578  
(87) 国際公開番号 W01997/035200  
(87) 国際公開日 平成9年9月25日(1997.9.25)  
審査請求日 平成16年3月2日(2004.3.2)  
(31) 優先権主張番号 19612001.2  
(32) 優先日 平成8年3月18日(1996.3.18)  
(33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

(73) 特許権者  
ビルグリム、ヘルベルト  
ドイツ国 ベルリン D-14169 ソ  
フィーシャルロット-ストウラッセ27a  
(74) 代理人  
弁理士 舟橋 榮子  
(72) 発明者  
ビルグリム、ヘルベルト  
ドイツ国 ベルリン D-14169 ソ  
フィーシャルロット-ストウラッセ27a  
審査官 横山 敏志

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 R▲下1▼緩和性を増加した超常磁性体粒子、前記粒子の製造方法およびその使用

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

粒子サイズが1から10ナノメートルの範囲であり、平均粒子直径 $d_{50}$ が2から4ナノメートルであり、増大した $R_1$ 緩和性が2から50の範囲であり、 $R_2/R_1$ 緩和性比が5以下である水酸化鉄、酸化鉄水和物、酸化鉄、混合した酸化鉄あるいは鉄；および、それらの表面にて脂肪族ジ-およびポリカルボン酸、これらの置換生成物および誘導体から選択される安定化物質、を含有し；重力場あるいは磁場において凝集あるいは沈降を防ぎ；そして、付加的な安定化物質、組織特異的結合物質、薬理的活性成分、薬理的活性細胞、薬理的活性キレート剤、細胞融合媒介物質あるいは遺伝子導入媒介物質、ならびにそれらの混合物を含有しないか又は1種以上含有する、増大した $R_1$ 緩和性および表面安定化物質を有する超常磁性単一ドメイン粒子。

## 【請求項2】

微小の超常磁性単一ドメイン粒子の粒子サイズが1から5nmの範囲であり、そして、微小の超常磁性単一ドメイン粒子が、水酸化鉄；酸化鉄水和物； $-Fe_2O_3$ ； $Fe_3O_4$ ；式中のMが二価の金属イオンFe、Co、Ni、Mn、Be、Mg、Ca、Ba、Sr、Cu、Zn、Ptあるいはそれらの混合物である、一般式 $mMO \cdot nFe_2O_3$ の混合鉄酸化物；式中のMeが三価の金属イオンAl、Cr、Bi、希土類金属あるいはそれらの混合物である、一般式 $mFe_2O_3 \cdot nMe_2O_3$ の混合酸化物；あるいは鉄からなり、式中のmおよびnは1から6の整数である、請求項1記載の超常磁性粒子。

## 【請求項3】

10

20

微小の超常磁性単一ドメイン粒子がそれらの表面に、マレイン酸、酒石酸、クエン酸、アスパラギン酸、およびそれらの混合物からなる脂肪族ジ - およびポリカルボン酸およびこれらの置換生成物および誘導体からなる群から選択される表面安定化物質を有している、請求項 1 あるいは請求項 2 記載の超常磁性粒子。

【請求項 4】

微小の超常磁性単一ドメイン粒子が、脂肪族ジ - およびポリカルボン酸およびこれらの置換生成物および誘導体からなる群から選択される安定化物質をそれらの表面にもつことに加え、さらにグリセロールおよびポリグリセロール基を含む物質、それらの置換生成物および誘導体からなる群から選択されるモノおよび/またはポリ水酸基を含む物質；芳香族ベンゼノイド、クマリン、リグナン、テルフェニル、フラボノイド、タンニン、キサントン、ベンゾフェノン、ナフトレン、ナフトキノ、アントラキノ、アントラサイクリン、ポリ環状縮合芳香族化合物およびリン酸基、ジリン酸基、ポリリン酸基、チオリン酸基、ホスホン酸基、チオホスホン酸基、カルボン酸基、硫酸基、メルカプト基あるいはシラントリオール基を含むそれらの誘導体から成る群から選択されるモノ - および/またはポリヒドロキシル基を含む芳香族物質；オリゴペプチド、ポリペプチド、たんぱく質、プロタイドおよびこれらの誘導体および変性生成物からなる群から選択されるアミノ酸を含む巨大分子；ビオチン、メルカプトプリン、メルカプトシトシン、メルカプトグアニン、メルカプトウラシル、メルカプトチミン、メルカプトヒポキサンチン、同じくそれらのメルカプトヌクレオシドおよびメルカプトデオキシヌクレオシドから選択される、チオ基を含む物質；珪酸基を含有するオルト珪酸物質、および二価および多価の無機イオン、有機酸および塩基との縮合生成物；リン酸基を含むオルトまたはメタリン酸の物質、それらの縮合生成物およびヘテロ縮合生成物、および無機イオンをもつ水不溶性塩化合物、およびスペルミン、スペルミジン、ポリエチレンイミン、プロタミン、オキシゼラチンおよびそれらの誘導体からなる群から選択される塩基性基を有する有機化合物；リン酸基、ジリン酸基、ポリリン酸基、チオリン酸基、ホスホン酸基、チオホスホン酸基、カルボン酸基、硫酸基、スルホン酸基、メルカプト基、シラントリオール基あるいはトリアルコキシシラン基を有する炭水化物の群からの物質、ポリエチレングリコール、ポリアルキレングリコール、アルキルポリエチレングリコール、アリールポリエチレングリコール、アルキルアリールポリエチレングリコール、ブロック共重合体 (PEG)<sub>n</sub> - (PEG)<sub>m</sub>、(PEG)<sub>n</sub> - (PPG)<sub>m</sub> - (PEG)<sub>n</sub> あるいは (PPG)<sub>m</sub> - (PEG)<sub>n</sub> - (PPG)<sub>m</sub> といったポリエチレングリコール (PEG) およびポリプロピレングリコール (PPG) のブロック共重合体；ムコ多糖、グリコプロタイド、キチン、およびそれらの誘導体および変性生成物からなる窒素含有多糖類；リン酸基を含有するヌクレオチドあるいはそれらのオリゴマーあるいはポリマー、およびそれらの混合物、から選択される安定化物質をその表面に有する、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の超常磁性粒子。

【請求項 5】

粒子を鉄塩溶液から有機および無機塩基によって沈殿し、ここで沈殿は 50 から 120 の範囲に温度を上げて実施され、そしてリンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アスパラギン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択される脂肪族ジ - およびポリカルボン酸およびそれらの置換生成物および誘導体からなる、溶解した安定化物質を、鉄塩溶液に沈殿中あるいはその直後に、単一ドメイン粒子量に基づいて 5 から 100 重量%の量で添加し；そして 1 から無限大の範囲である Fe<sup>3+</sup> / Fe<sup>2+</sup> 濃度比が、還元剤あるいは酸化剤を沈殿物質に添加することで達成され；次に、沈殿物質を透析、フィルター濾過、超音波、磁場、遠心分離またはそれらの組み合わせによって精製して 1 から 10 ナノメートルの所望の粒子サイズを分離し；そして、安定化物質、組織特異的結合物質、薬理的活性物質、薬理的活性細胞、薬理的活性キレート試薬、細胞融合媒介物質および遺伝子導入媒介物質、それらの混合物からなる安定化物質の群から選択される付加的物質を、粒子に結合させるところの、R<sub>1</sub> 緩和性が際立って改変され、そして表面安定化物質をもつ、超常磁性単一ドメイン粒子の製造方法。

【請求項 6】

10

20

30

40

50

薬理的に許容できる担体および1から10ナノメートルの範囲の粒子サイズである請求項1記載の超常磁性粒子、組織特異的結合物質、薬理的活性物質、薬理的活性細胞、薬理的活性キレート試薬、細胞融合媒介物質および/または遺伝子導入媒介物質；それらの混合物からなる群から選択される組み合わせからなる、造影剤用薬理的調製品。

【請求項7】

請求項1記載の増大した $R_1$ 緩和性および表面安定化物質を有する超常磁性単一ドメイン粒子を薬理的調製品において含有するNMR診断における造影剤。

【請求項8】

腫瘍破壊、免疫増強、磁気薬剤標的、細胞融合、遺伝子導入のために、NMR診断における造影剤として、磁場の影響下に、請求項7記載の薬理的調製品において含有する磁気薬剤標的剤。

10

【発明の詳細な説明】

本発明はNMR断層撮影での診断法として、薬理的活性物質として使用できる $R_1$ 緩和性を増加した超常磁性体に関するものである。本発明はまた製造工程および新規な粒子の使用に関するものである。

ヨーロッパ特許第B284,549号は、粒径が3から20ナノメートルの範囲にあり、燐酸基、二燐酸基、ポリ燐酸基、チオ燐酸基、ホスホン酸基またはチオホスホン酸基を含有するポリアルキレングリコール、燐酸基を含有するヌクレオチド、それらのオリゴマーまたはポリマー、および、燐酸基を表面に化学的に結合して含有し、付加的な結合部位を選択的に持った炭水化物、の群からなる有機化合物をもっている、酸化鉄、混合した酸化鉄または鉄の超常磁性体の単一ドメイン粒子を記載している。

20

独国特許第DE-A 4,309,333号は、粒径が10から1000ナノメートルの範囲にあり、磁場では限定された動きをする、安定していて、分解可能な集合体と、粒子の大きさが3~20ナノメートルである鉄酸化物、混合鉄酸化物や鉄といった多数の小さな超常磁性単一ドメイン粒子より成る集合体が、リン酸基、ジリン酸基、ポリリン酸基、チオリン酸基やホスホン酸基あるいはチオホスホン酸基を含むポリアルキレングリコールの基の物質か、あるいはそのオリゴマーやポリマーが化学的に表面に結合しているような、炭水化物やリン酸基を含有するヌクレオチドを有しているという記述がある。

国際特許W096/03653には、超常磁性単一ドメイン粒子や、表面に有機物質が結合している超常磁性単一ドメイン粒子の集合体により構成されている超常磁性粒子を開示している。超常磁性粒子は、大きさが3~50ナノメートルである小さな超常磁性単一ドメイン粒子と、大きさが10~1000ナノメートルである小さな超常磁性単一ドメイン粒子の安定、かつ分解可能な集合体との混合により構成されており、水酸化鉄、酸化鉄水和物、酸化鉄と混合した酸化鉄、あるいは、モノおよび/またはポリ水酸基を持つ芳香族の物質、ポリグリセロール、アミノ酸基を持つ物質、オルトケイ酸といったケイ酸基を持つ物質とその縮合生成物、そしてオルトあるいはメタリン酸といったリン酸基を持つ物質とその縮合生成物が表面に結合している鉄より成っている。

30

大きさが3~50ナノメートルの超常磁性単一ドメイン粒子は、記載されあるいは使用されている従来技術に基づいて生成することができ、例えば5~20nmのうちの好ましい直径の粒子を用いてNMRトモグラフィーの造影剤として用いることができる。このような粒子が蓄積した体の部位では、 $T_2$ 緩和時間の大幅な短縮、またシグナルの暗化につながる。それゆえ、超常磁性単一ドメイン粒子に関連してネガティブNMR造影法についても言及される。 $T_1$ 緩和時間は、緩和性 $R$ と反比例するため、 $T_1$ 緩和時間が短くなるほど緩和性 $R$ は増大する。 $T_2$ 緩和時間は磁性粒子の粒子直径と一次関数の関係にある。粒子直径が大きくなるほど、 $T_2$ 緩和時間の短縮が顕著になり、負のコントラストを得るのに要する粒子密度が小さくなる。造影剤は体重1kgあたり10~20mmol Feが必要で、これは過去に使用されたガドリニウムキレートに基づいた正のNMR造影剤と比較してずっと小さい。

40

そのような負の造影剤の $T_1$ 緩和時間は大きく短縮されないため、それらが蓄積している体の部位におけるNMRトモグラフィーの特筆すべきシグナル増大はない。組織中ではあまりシグナルは点灯しない。多くの応用例においては増大した正のNMR造影剤効果を持

50

つ超常磁性単一ドメイン粒子を使用できると有利であろう。

もし、T1強調NMRTモグラフィーが実施されると、緩和性比 $R_2/R_1$ はできるだけ小さく、少なくとも5以下でなくてはならない。

$R_1$ 緩和性は粒子直径が減少しても大きくは変わらないが、 $R_2$ 緩和性は小さくすることができる。超常磁性単一ドメイン微小粒子を用いれば、緩和性比 $R_2/R_1$ は大いに小さくなり、T1強調NMRTモグラフィーが実行可能になる。超常磁性単一ドメイン粒子がごく低濃度でもシグナル強度に影響を与えるため、過去に使われた常磁性の造影剤よりも優れることができる。

本発明の目的は、例えばT1強調NMRTモグラフィーの造影剤として使用可能な、超常磁性単一ドメイン微小粒子を開発することである。

本発明によれば、これは、粒子の大きさが1~10ナノメートルであり、平均粒子直径 $d_{50}$ が2~4ナノメートルであり、2~50の範囲に増大した $R_1$ 緩和性と、5以下の $R_2/R_1$ 緩和性比をもつ、水酸化鉄、酸化鉄水和物、酸化鉄、混合酸化鉄、あるいは鉄といった粒子からなり、それらの表面に重力場や磁場において集合や沈殿を防ぐ安定化物質を有し、任意に組織特異的結合物質、薬理的活性物質、薬理的活性細胞、薬理的活性キレート剤、細胞融合媒介物質、又は遺伝子導入媒介物質、それらの混合物を任意に含む、増大した $R_1$ 緩和性および表面安定化物質を有する超常磁性単一ドメイン粒子を以てすれば達成可能である。

この目的を達成するためのいくつかの可能な方法が見つけた：

1. 超常磁性単一ドメイン粒子の磁気感受性を減じる方法
2. 超常磁性単一ドメイン粒子の粒子直径を1~10nm、好ましくは2~4nmに縮小する方法
3. 安定化物質を選択する方法
4. 安定化物質の層の厚さと水分含有量による方法

ごく小さい超常磁性単一ドメイン粒子は以下の物質より構成されうる：

水酸化鉄、酸化鉄水和物、 $-Fe_2O_3$ 、 $Fe_3O_4$ 、一般式 $mMO \cdot nFe_2O_3$  (Mは二価の金属イオンFe、Co、Ni、Mn、Be、Mg、Ca、Ba、Sr、Cu、Zn、Ptあるいはそれらの混合)で表される混合酸化鉄、一般式 $mFe_2O_3 \cdot nMe_2O_3$  (Meは三価の金属イオンAl、Cr、Bi、希土類金属あるいはそれら又は鉄の混合を表し、mとnは1~6の整数を表す)で表される混合酸化物。このため、単一ドメイン粒子の組成と構造によって、その磁気感受性は大きく変化することができ、 $R_2/R_1$ 緩和性比も5以下の値を取り得る。しかしながら、医療における使用に際しては、単一ドメイン粒子個々の成分の毒性を考慮に入れることが重要である。

本発明によると、超常磁性単一ドメイン微小粒子の磁気感受性は、鉄塩溶液の構成と製造方法によって約1~100EMU/gの広い範囲で調整可能である。

驚くべきことに、鉄塩溶液の構成の変化は $R_2/R_1$ 緩和性比に影響を及ぼすことがわかった。鉄塩溶液の $Fe^{3+}/Fe^{2+}$ の濃度比を2から10に上げることによって、磁気感受性をおよそ100EMU/gからおよそ20EMU/gにまで減らすことができる。

微小単一ドメイン粒子の沈殿後の酸化あるいは還元反応によって、 $R_2/R_1$ 緩和性比は任意に変えることができる。酸化還元剤としてふさわしいものには例えば硝酸イオン、過酸化水素、水酸化アミン、アスコルビン酸などを含む。

驚くべきことに、高められた温度、また任意に高められた圧力のもとで、沈殿の直前、最中、または直後に安定化物質溶液を、水または水和性有機溶媒に加え、水溶性あるいは水和性の有機溶媒を含む鉄塩溶液由来の塩基で粒子を沈殿させることによって、あるいは安定化物質と塩基の混合物での沈殿によって、あるいはもし安定化物質もまた塩基である場合は、ただ有機塩基を加えることによって、超常磁性単一ドメイン粒子の粒子の大きさをさらに小さくすることができることがわかった。50 から120 という沈殿化の温度が有利だと明記されよう。温度が100 以上だとオートクレーブ中で実行される。沈殿の直前、最中、あるいは直後に安定化物質を加えることによって、前述の酸化還元反応を防ぐことができ、超常磁性単一ドメイン微小粒子が生成される。

超常磁性単一ドメイン微小粒子の粒子の大きさは1~10nm、特に2~4nmという粒子直径の平均 $d_{50}$ の範疇に入る。粒子の大きさが1~10nmで、粒子直径の平均 $d_{50}$ が2~4nmという

10

20

30

40

50

記述は常に安定化物質を除いた粒子についてのものである。

粒子の大きさの縮小に伴い、生物学的許容性もまた向上し、体内での分解速度も増大する。体内での超常磁性微小粒子の生体利用率は、粒子の大きさや安定化物質の組成などに依存する、すなわち細網内皮システムが超常磁性微小粒子を比較的ゆっくり結合させるため、数時間から数日である。

本発明の目的は、それぞれの磁気粒子の物理化学的また生理学的特性を、それぞれの応用例に最適に適用させるため、超常磁性単一ドメイン微小粒子が凝集したり沈殿したりしないように安定化させる物質の範囲を広げることでもある、そして、これらの物質は安定していて、容易に合成できるものであるべきである。

驚くべきことに、現在の技術段階で知られている比較的大きなポリマー分子やマクロ分子だけでなく、小さな分子でさえも超常磁性単一ドメイン微小粒子の安定化物質としてふさわしいということがわかっている。

脂肪族ジ-およびポリカルボン酸と、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アスパラギン酸といったその置換生成物と誘導体は超常磁性単一ドメイン微小粒子のふさわしい安定化物質である。

たとえばクエン酸によって安定化された本発明による超常磁性単一ドメイン微小粒子は、過去に生成された、いかなるポリマーでコーティングされた超常磁性酸化鉄よりも直径が小さい。それゆえ、今やたとえば安定化粒子の平均粒子直径が4~8nmである100,000 Dフィルターによって濾過されうる、粒子直径平均  $d_{50}$  範囲が2~4nmである安定化された超常磁性単一ドメイン粒子を生成することが可能である。  $R_2/R_1$  緩和性比はそれゆえ1~3の値にまで下げることができる。

それゆえ、血液中でのこの新しい超常磁性単一ドメイン微小粒子の半減期は、元来の粒子のそれよりもずっと長いことにより、例えばT1強調NMRトモグラフィ、アンジオグラフィ、リンホグラフィ、血栓や腫瘍の診断といった可能な応用範囲が大いに広がることとなった。

また驚くべきことに、安定化物質のタイプと量が、超常磁性単一ドメイン粒子の  $R_2/R_1$  緩和性比に影響を与えることがわかった。たとえば、安定化物質の親水性が増すことによって、すなわち水和化の度合いが増すことによって、  $R_2/R_1$  緩和性比が小さくなる。また安定化物質の量は粒子の大きさに影響する。安定化物質の濃度の増加に伴って、粒子直径が小さくなる。

もし追加される安定化物質が粒子の表面に結合したら、結果として生じる超常磁性単一ドメイン微小粒子の物理化学的また生理学的特性が、それぞれの応用例に最適化されうる。これらの追加される安定化物質は、以下より選択できる。ベンゼノイド、クマリン、リグナン、テルフェニル、フラボノイド、タンニン、キサントン、ベンゾフェノン、ナフタレン、ナフトキノ、アントラキノン、アントラサイクリン、ポリサイクリック縮合芳香族化合物とその誘導体といったモノヒドロキシル基あるいはポリヒドロキシル基を有する芳香族物質；アルブミン、グロブリン、オリゴペプチド、ポリペプチドといったアミノ酸、またはゼラチン、加水分解カゼイン、グルテリンといったプロテインやプロタイドの変性生成物を有する物質；メルカプトプリン、メルカプトシトシン、メルカプトグアニン、メルカプトウラシル、メルカプトチミン、メルカプトヒポキサンチン、それらのメルカプトヌクレオシドおよびメルカプトデオキシヌクレオシドといったチオ基を有する物質；ケイ酸基を有するオルトケイ酸、および、二価と多価の無機イオンおよびフィチン酸、アルギニン酸、没食子酸といった有機酸との縮合生成物；リン酸基を有するオルトリン酸あるいはメタリン酸、また、ピロリン酸、ポリリン酸、シクロリン酸およびそれらのヘテロ縮合生成物といったそれらの縮合生成物、それからスペルミン、スペルミジン、ポリエチレンジアミン、プロタミン、オキシゼラチン、およびその誘導体といった塩基性の基を持った有機化合物との反応生成物；リン酸基、グリル酸基、ポリリン酸基、チオリン酸基、ホスホン酸基、チオホスホン酸基、カルボキシル基、スルホ基、スルホン酸基、メルカプト基、シラントリオール基を有する炭水化物より成る有機物質；ポリアルキレングリコール、アルキルポリエチレングリコール、アリールポリエチレングリコール、アルキルアリールポ

10

20

30

40

50

リエチレングリコール；リン酸基を有するヌクレオチドとそのオリゴマーやポリマー；ムコポリサッカライド、グリコプロタイド、チティンといった窒素含有ポリサッカライドとその誘導体。

安定化物質は従来技術で生成可能であり、商業的にも入手可能である。

安定化分子に結合しうる物質は以下の通りである。抗原、抗体、リボ核酸、デオキシリボ核酸、リボ核酸シークエンス、デオキシリボ核酸シークエンス、ハプテン、アビジン、ステレプタビジン、プロテインA、プロテインG、エンドトキシン結合タンパク、レクチン、セレクチン、オルガネラ表面タンパクといった組織特異的結合物質；ウィルス、微生物、藻類、菌類；抗腫瘍タンパク、酵素、抗腫瘍酵素、抗生物質、植物アルカロイド、アルキル化試薬、抗代謝剤、ホルモン、ホルモン拮抗薬、インターロイキン、インターフェロン、成長因子、TNF、エンドトキシン、リンホトキシン、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、プラスミノゲンストレプトキナーゼ促進複合体、組織プラスミノゲンアクティベーター、デスモプラスミノゲンアクティベーター、マクロファージ活性体、抗血清、血液成分、細胞成分とそれらの分解生成物と派生物、オルガネラ、ウィルス、微生物、藻類、菌類の細胞壁構成要素とその分解生成物と派生物、プロテアーゼインヒビター、アルキルホスホコリン、放射性アイソトープ含有物質、表面活性剤、心臓血管系作用薬、化学療法薬剤、胃腸薬、神経作用薬といったあらゆる薬理的活性物質；オルガネラ、ウィルス、微生物、藻類、菌類、特に赤血球、血小板、顆粒球、単球、リンパ球、ランゲルハンス島といったあらゆる薬理的活性細胞；ポリカルボン酸、ポリアミノ酸、ポルフィリン、カテコールアミンといったあらゆる薬理的活性キレート剤；ポリエチレングリコール、アルキルポリエチレングリコール、アリアルポリエチレングリコール、アルキルアリアルポリエチレングリコールとそれらの誘導体などのあらゆる細胞融合を促進する物質；ポリエチレングリコールとその誘導体のように遺伝子輸送を媒介するあらゆる物質；ポリエチレンイミン、スペルミン、スペルミジン、プロタミンサルフェートのようなポリアミン化合物；それらの混合物も同様である。

凝集と沈殿を防ぐための沈殿反応によって生成される超常磁性粒子を安定化させるための方法として従来技術のレベルでは二つの可能性がある。

1. 超常磁性粒子は鉄塩溶液より沈殿することにより用意され、精製され、それから適した安定化物質によって安定化される、というもの、あるいは
2. 超常磁性物質を鉄塩溶液と混合し、その混合物をそれぞれの沈殿温度まで熱し、沈殿が起こるといふもの

$Fe^{3+} / Fe^{2+}$ 塩溶液の混合は反応性酸化還元システムになっているため、安定化物質の一部は酸化あるいは還元されるかもしれない、 $Fe^{3+} / Fe^{2+}$ の濃度比は不可逆的に変化する。多くの安定化物質候補あるいは多くの鉄塩溶液の有機アニオンでさえ、非磁気的あるいは不可逆的沈殿物の生成にもつなげる鉄塩との錯体を形成する。

高められた  $R_1$  緩和性と表面安定化物質を持つ超常磁性単一ドメイン微小粒子を生成する方法は、50 から120 に高められた温度で鉄塩溶液から、アルカリ水溶液、アンモニア水あるいは有機塩基化合物といった塩基とともに粒子が沈殿するというものである。温度が100 を越すと、その工程はオートクレーブ中で行われる。沈殿化は安定化物質と塩基の混合物とともに行われてもよく、あるいはもし安定化物質も塩基であるなら、有機塩基化合物を加えるだけで沈殿させてもよい。同時に安定化物質として機能する有機塩基化合物は、たとえばポリエチレンイミン、スペルミン、スペルミジンあるいはプロタミンといったものを含む。脂肪族ジカルボン酸と脂肪族ポリカルボン酸とそれらの置換生成物と誘導体から構成される溶解安定化物質、例えばリンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アスパラギン酸は、単一ドメイン粒子の量に応じて5~100重量%の分量を沈殿中かあるいは沈殿直後鉄塩溶液に加えられる。

酸化剤や還元剤を加えることによって、望ましい  $R_2 / R_1$  緩和性比変化に到達するまで、沈殿生成物中の  $Fe^{3+} / Fe^{2+}$  の濃度比を1から無限大 ( $-Fe_2O_3$ ) までの範囲で調整することができる。このようにして生成される大変微小で安定化された超常磁性粒子の分散は、冷却され、例えば塩酸で中和され、その分散は濾過液の電導性が10mS/cm以下になるま

10

20

30

40

50

で透析される。

いくつかの安定化物質については、安定した分散物を調製するために、例えば超音波の作用によってより多くのエネルギーを投入することが必要である。安定した分散物は、磁場のなかや遠心分離にかけることによって沈殿したごく小さな超常磁性粒子から容易に分離しうる、より大きいあるいは弱く結集した超常磁性単一ドメイン粒子も含まれてもよい。安定化した超常磁性単一ドメイン微小粒子がカップルする追加の安定化物質のグループ、組織特異的結合物質、薬理的活性物質、薬理的活性細胞、薬理的活性キレート剤、細胞融合媒介物質、遺伝子輸送媒介物質、それらの混合物といった任意に追加される物質。本発明による超常磁性微小粒子の調製を以下実施例に基づき説明する。

実施例 1 :

蒸留水 1 リットルに塩化鉄 (III) (270g) と塩化鉄 (II) (119g) を無酸素下で 100 に熱してかき混ぜながら加える。アンモニア水とクエン酸 35g の混合物を加えることによって溶液の pH は攪拌中に 10 に調整され、その混合物を 10 分間沸騰させる。ついでその分散体をおよそ 20 に冷却し、塩酸で pH7 に調整し、蒸留水で透析物が 10mS / cm より小さな伝導率になるまで透析し、そして次に、300W の出力で 20 分間超音波で分散した。大きめの粒子および弱く凝集した超常磁性粒子を除去するために、分散液を 10,000rpm で 10 分間遠心分離した。ごく小さな超常磁性粒子は生理的食塩水と混合して、NMR 診断のための正の静脈造影剤として利用することができる。

10

実施例 2

実施例 1 からの超常磁性単一ドメイン微小粒子の分散液 100ml を、10mT の飽和磁気誘導で、4g のリン酸メトキシポリエチレングリコール (分子量 1000) 、1g ルチンおよび 50ml メタノールからなる溶液と混合し、次にメタノールを真空中で蒸留した。分散液に水を加えて、100ml を得、水酸化ナトリウムを加えて pH を 7.0 に調整した ; 混合物を次に 100W の出力で 10 分間超音波で分散し、そして次に大きめの粒子あるいは弱く凝集している超常磁性単一ドメイン粒子を除去するために 10,000rpm で 10 分間遠心分離した。超常磁性微小粒子は、NMR 診断において血管造影のための正の静脈造影剤として利用することができる。

20

実施例 3

実施例 2 からの超常磁性単一ドメイン微小粒子の分散液 20ml を、1mT の飽和磁気誘導で、10mg ドキソルピシンの 10ml 生理的食塩水とともに混合した。この超常磁性微小粒子は、腫瘍中に蓄積するためにあるいは前記腫瘍に攻撃を加えるために適切である。

30

実施例 4

塩化鉄 (III) (50.3g) および硫酸鉄 (II) (139g) を、蒸留水 1 リットルに、酸素不在で攪拌し、85 まで加熱しながら溶解した。25% 水酸化アンモニウム溶液を滴下しながら、10.5 の pH を確立した。沈殿直後に、分散液を、5g の L-アスパラギン酸および 25g の酒石酸水溶液 500ml に混合し、20 分間 85 で攪拌した。次に、分散体を約 20 に冷却し、塩酸によって pH を 7.0 に調節し、そして 30% 過酸化水素水 20ml と混合し、気体の放出がなくなるまで攪拌した。分散液を 300W の出力で 20 分間超音波で分散し、次に透析物が 10mS / cm より小さな伝導率になるまで透析した。大きめの粒子および弱く凝集した超常磁性粒子を除去するために、分散液を 10,000rpm で 10 分間遠心分離した。超常磁性微小粒子は、NMR 診断において血管造影のための正の静脈造影剤として利用することができる。

40

実施例 5

実施例 4 からの超常磁性単一ドメイン微小粒子の分散液 100ml を、5mT の磁気飽和誘導で、4g リン酸メトキシポリエチレングリコール (分子量 2000) および 0.4g ラウリルオキシポリエチレングリコール (分子量 1000) の 50ml 水溶液とともに混合した。超常磁性微小粒子は、生理的食塩水とともに混合して、NMR 診断においてリンパ管造影および腫瘍診断のための造影剤として利用する。

実施例 6

実施例 4 からの超常磁性単一ドメイン微小粒子の分散液 100ml を、5mT の飽和磁気誘導で、1g オキシゼラチンの 50ml 水溶液とともに混合した。ごく小さな超常磁性粒子は、生理オキシゼラチン溶液とともに混合して、NMR 診断においてリンパ管造影および腫瘍診断のための

50

造影剤として利用する。

#### 実施例 7

塩化鉄(III) (50.3g) および硫酸鉄(II) (139g) を、蒸留水 1 リットルに、酸素不在で攪拌し、100 ℃まで加熱しながら溶解した。25% 水酸化アンモニウム溶液を滴下しながら、10.5のpHを確立した。沈殿直後に、分散液を、40gのリンゴ酸水溶液500mlに混合し、10分間100 rpmで攪拌した。次に、分散液を約20 ℃に冷却し、塩酸によってpHを7.0に調節し、そして30% 過酸化水素水20mlと混合し、気体の放出がなくなるまで攪拌した。分散液を300Wの出力で20分間超音波で分散し、透析物が10mS/cmより小さな伝導率になるまで透析した。大きめの粒子および弱く凝集した超常磁性粒子を除去するために、分散液を10,000 rpmで10分間遠心分離した。超常磁性微小粒子は、NMR診断において血管造影のための正の静脈造影剤として利用することができる。

10

#### 実施例 8

実施例 7 からの超常磁性単一ドメイン微小粒子の分散液100mlを、5mTの飽和磁気誘導のもと、4gスベルミジンの水溶液50mlとともに混合した。ごく小さな超常磁性粒子は、遺伝子導入の目的のために、リン酸基を含むヌクレオチド、そのオリゴマーあるいはポリマー溶液とともに混合することができる。

超常磁性単一ドメイン微小粒子の代表的なデータは、

粒子直径  $d_{50}$  : 4nm

安定剤とのトータル直径 : 8nm

鉄(II)含有量 : 6%

$R_1$ 緩和性 : 30L / mmol · s

$R_2$ 緩和性 : 56L / mmol · s

$R_2 / R_1$ 緩和性比 : 1.87

を含んでいる。

本発明によるごく小さな常磁性粒子を使用する主要分野は、アンジオグラフィー、リムフォグラフィーのためのNMR造影剤、血栓および腫瘍の診断、腫瘍破壊、トロンビンの溶解、免疫性増強、細胞融合あるいは遺伝子導入の媒介で、これらにおいては、腫瘍治療、血栓溶解、細胞融合および遺伝子導入の効力は、NMR診断法によって測定される。

腫瘍中において、超常磁性単一ドメイン微小粒子、特にメトキシポリエチレングリコールリン酸塩あるいはホスホン酸塩によって安定化された超常磁性単一ドメイン微小粒子は、血流に注入されると蓄積を測定できるので、血栓診断に使用される。

30

超常磁性単一ドメイン微小粒子に、薬理的に効力のある物質を結合させることによって、特に、メトキシポリエチレングリコールリン酸塩あるいはホスホン酸塩によって安定化するか、腫瘍特異的抗体を使用するとき、作用部位におけるこれらの粒子濃度は増加する。腫瘍の化学療法に使用される物質は非常に強い副作用を体全体におよぼすので、この環境はガン治療において重要であり、そして患者の体の他の部分は、反応部位に物質が濃縮されるときには細胞成長抑制剤によってそれほど大きくストレスを受けない。

$T_1$ 強調のNMRトモグラフィーにおける非経口的なボジの造影剤として、これらの粒子によって動物実験では良好な結果が得られ、血液循環のために、血栓および腫瘍の診断のために、胃腸管を造影するために、あるいは抗体特異的造影剤として使用されても同様であった。高い血液半減期は、網内皮系が粒子をゆっくりと吸収するので、ここでは正の効果をもち、かつ粒子が抗体と結合するときには特に、これらは血流中を長期間にわたって移動して、このため結合部位に増加した濃度で蓄積することができる。

40

$T_2$ 強調のNMRトモグラフィーにおいては、超常磁性単一ドメイン微小粒子が肝臓、脾臓、骨髄およびリンパ節の良好な負の対照を与える。

超常磁性単一ドメイン微小粒子の使用される量は概算で5 から20mM Fe / 体重kgで、NMRの非経口造影剤が使用され、経口造影剤として使用されるときは、10mM Fe / 体重kgである。

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
<b>G 0 1 N 33/543</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N 33/543	5 4 1 A
<b>C 1 2 N 15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00	A
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00	

(56)参考文献 特表平 0 8 - 5 0 8 7 2 1 ( J P , A )  
 特表平 1 0 - 5 0 3 2 8 1 ( J P , A )  
 特表平 0 3 - 5 0 4 3 0 3 ( J P , A )  
 特開昭 6 3 - 2 5 5 2 3 7 ( J P , A )  
 特表 2 0 0 6 - 5 0 2 5 7 2 ( J P , A )  
 国際公開第 9 0 / 0 0 7 3 8 0 ( W O , A 1 )  
 特表昭 6 4 - 5 0 0 1 9 6 ( J P , A )

D.Pouliquen et al., Investigation of the magnetic properties of iron oxide nanoparticles used as contrast agent for MRI, Magnetic Resonance In Medicine, Academic Press, 1992年, Vol.24, No.1, pp.75-84

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C01G 49/00 - 49/08  
 A61B 5/055  
 A61K 47/02  
 C12M 1/00  
 C12N 15/09  
 G01N 33/543  
 G01N 22/00 - 22/04  
 G01N 24/00 - 24/14  
 G01R 33/24 - 33/465  
 G01R 33/54  
 G01R 33/60 - 33/64  
 A61K 48/00  
 WPI  
 CPlus(STN)